

اثرات دوزهای پایین اتانول بر نوزادان موش صحرایی شیرخوار: فعالیت آنزیمی، تغییرات بافتی و شاخص های رشد

دکتر مجتبی عباسی^۱، دکتر عبدالرسول نامجو^{۲*}

^۱دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۲۴ اصلاح نهایی: ۹۲/۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۹

چکیده:

زمینه و هدف: غلظت های پایین اتانول می توانند از طریق جفت به جنین و از طریق شیر مادر به نوزاد تازه متولد شده منتقل شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات دوزهای مختلف اتانول در طول دوره شیردهی بر تغییرات آنزیمی، بافتی و شاخص های رشد نوزادان شیرخوار در موش صحرایی انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۲۱ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار به سه گروه شامل دو گروه تیمار و یک گروه شاهد تقسیم شدند. به گروه های تیمار از روز یک زایمان تا روز ۲۴ شیردهی آب آشامیدنی به همراه اتانول با غلظت حجمی ۲ و ۴ درصد تجویز شد و گروه شاهد تنها به آب آشامیدنی دسترسی داشتند. از هر گروه، ۹ سر نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه انتخاب و فعالیت سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، گاماگلوتامیک ترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز، کراتین فسفوکیناز، نیتروژن اوره خون و کراتینین اندازه گیری شدند. همچنین مطالعات آسیب شناسی بر روی بافت های مغز، کبد و کلیه انجام شد. داده ها به کمک آزمون های آماری آنالیزواریانس و تست دانت در نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. **یافته ها:** در گروه های تجربی میزان فعالیت سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز، نیتروژن اوره خون، کراتین فسفوکیناز و آلکالین فسفاتاز اختلاف معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان ندادند ($P>0/05$)؛ اما فعالیت آنزیمی لاکتات دهیدروژناز و کراتینین در نوزادان مادرانی که اتانول ۴٪ حجمی دریافت می کردند بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P<0/05$). مطالعات هیستوپاتولوژیک آسیب های مختلفی را در بافت مغز، کبد و کلیه نوزادان در معرض اتانول ۴٪ حجمی را نشان داد. **نتیجه گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، مصرف نوشیدنی های الکلی در دوران شیردهی می تواند ضایعات جبران ناپذیری بر روی نوزاد داشته باشد.

واژه های کلیدی: اتانول، موش صحرایی، شیردهی، مسمومیت عصبی، نوزادان شیرخوار.

مقدمه:

بین سطوح پرولاکتین و اکسی توسین مادر تاثیر منفی دارند (۳). اطلاعات یک دهه اخیر نشان می دهد وقوع بیماری کبد الکلی و مرگ و میر ناشی از آن افزایش یافته، بطوری که درصد مرگ و میر ناشی از بیماری کبد الکلی به ترتیب در فرانسه و آمریکا ۱۴/۳ و ۷/۹ در ۱۰۰۰۰۰ از جمعیت است (۴). مصرف مقادیر زیادی از اتانول عوارض شناخته شده ای بر روی بافت های کبد، قلب، پانکراس و سیستم عصبی دارد

شرایط تغذیه در دوران بارداری نقش عمده ای در فعل و انفعالات متابولیک و هورمونی بین بدن مادر، جفت، جنین و نوزاد دارد؛ علاوه بر این، رشد جنین تحت تاثیر فرآیند تغذیه ای مادر است (۱). این تصور که نوزادان می توانند تحت تاثیر اجزاء سازنده شیر قرار بگیرند، سابقه طولانی دارد (۲). مطالعات انجام شده در زنان شیرده نشان می دهد که مصرف نوشیدنی های الکلی در دوزهای متوسط بر روی تولید شیر، تعادل

* نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، گروه پاتولوژی، تلفن: ۰۲۸۱-۳۳۶۱۰۶۰ E-mail: ar.namjo72 @iaushk.ac.ir.

(۵). علیرغم شناخت اثرات تراتوژنیک مصرف مزمن اتانول بر روی تکامل جنین، همچنان در جوامع غربی نوشیدنی های الکلی توسط خانم های آبستن مصرف می شود (۶). به نظر می رسد الکل سر دسته ی علل عقب ماندگی ذهنی و ناهنجاری مادرزادی است، که مجموعاً به عنوان نشانگان جنین الکلی شناخته می شوند (۷). هر سال ۱۲۰۰۰ نوزاد با طیفی از اختلالات نشانگان جنینی الکلی به دنیا آمده و سه برابر بیش از این دارای اختلالات تکامل عصبی مرتبط با الکل و نقائص تولد مرتبط با الکل هستند و در مجموع این موارد، نوزادان بیشتری را نسبت به نشانگان داون، فیروز سیستمیک، مهره شکاف دار، بیرون زدگی نخاع و نشانگان مرگ ناگهانی نوزادان به خود اختصاص می دهد (۸). مطالعات گسترده بر روی نوزادان حیوانات آزمایشگاهی و انسان نشان داده که مصرف کوتاه مدت اتانول باعث مرگ برنامه ریزی شده در سلول های عصبی، کاهش رشد مغز و اختلال در عملکرد آلونول های ریوی (۹) و رشد ناکامل کلیه (۶) می شود. مواجهه با مقادیر بالای اتانول در طی دوره تکامل سیستم اعصاب مرکزی، موجب نقص در حافظه، یادگیری، کاهش سلول های عصبی هیپوکامپ و تغییرات نوروپاتولوژیک می شود (۱۰). همچنین ثابت شده است که کاهش موقت سطوح پلاسمایی رتنوئیک اسید، فاکتوری است که با پیشرفت نشانگان الکل جنینی در ارتباط است (۶).

کبد و کلیه از مهمترین ارگان های متابولیسم، سم زدا، ذخیره و دفع مواد با منشاء خارجی و دیگر متابولیت ها هستند و به عوامل آسیب رسان بسیار حساسند. کبد مهمترین ارگان هدف برای اتانول است (۱۱). بیماری کبد الکلی نشان دهنده طیف وسیعی از بیماری ها و تغییرات مورفولوژیک شامل: کبد چرب، التهاب و نکروز کبد (هپاتیت الکلی) تا فیروز پیشرونده (سیروز الکلی)، هپاتیت مزمن مرتبط با ویروس است و خطر کارسینومای سلول های کبد را افزایش می دهد (۴). فرهنگ های مختلف بشری، به این سوال که

مصرف نوشیدنی های الکلی توسط مادران شیرده می تواند بر نوزاد شیرخوار تاثیر بگذارد مورد گمانه زنی های جامعه پزشکی قرار گرفته است؛ چرا که دفع الکل در شیر به مقدار محدود و ناچیز در نظر گرفته می شود، مگر مواردی که مادر مقدار بسیار زیادی الکل مصرف کرده باشد یا در بطری شیر نوزاد، الکل وجود داشته باشد (۲). این پژوهش با هدف بررسی تاثیر دوزهای پایین اتانول بر روی فعالیت های بیوشیمیایی، تغییرات بافتی و شاخص های رشد نوزادان موش صحرایی طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی:

این مطالعه تجربی- مداخله ای بر روی ۲۱ سر موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۱۰ گرم در شرایط محیطی استاندارد، دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، غذای پلت شده و آب لوله کشی شهری در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. جهت انجام آزمایش پس از ثبت وزن اولیه، هر ۳ موش صحرایی ماده از ساعت ۹ شب تا ساعت ۷ صبح روز بعد با یک موش نر به منظور جفت گیری در مجاورت همدیگر قرار گرفتند. پس از مشاهده واژینال پلاک و اسمیر واژینال مثبت (به منظور تشخیص آبستنی) (۱۲)، موش های صحرایی ماده آبستن بصورت تصادفی در سه گروه هفت تایی، شامل دو گروه تیمار جهت دریافت اتانول با غلظت های ۲ و ۴ درصد حجمی در آب آشامیدنی (۱۳) و یک گروه شاهد (آب آشامیدنی فاقد اتانول) تقسیم شدند. موش های صحرایی ماده شیرده گروه های تیمار یک و دو به ترتیب، از روز زایمان به مدت ۲۴ روز اتانول (ساخت شرکت مرک کشور آلمان) در غلظت های ۲ و ۴ درصد با میانگین مصرف آب آشامیدنی ۵۰ میلی لیتر در روز، دریافت کردند. همچنین گروه شاهد آب آشامیدنی فاقد هر گونه ماده افزودنی دریافت کرد.

تعداد نوزادان هر مادر در گروه های تحت مطالعه ۹ سر در نظر گرفته شد و نوزادان هر هفت روز یکبار با ترازوی دیجیتالی توزین و قطر آهیانه و طول تاجی دمی با کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی متر اندازه گیری شد. در پایان دوره آزمایش (روز ۲۵ بعد از زایمان) بطور تصادفی ۹ نوزاد از هر گروه تیمار (مجموعاً ۲۷ نوزاد) انتخاب و پس از توزین بوسیله ترازوی دیجیتالی، هر نوزاد با استفاده از کلروفرم بیهوش شد. سپس با باز کردن قفس صدری و خون گیری از قلب، بدون ماده ضد انعقاد، در دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سرم آن جدا و فعالیت سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، گاماگلوتامیک ترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز، کراتین فسفو کیناز، نیتروژن اوره خون و کراتینین توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل BT-3000 ساخت شرکت بیوتکنیکا کشور ایتالیا) با استفاده از کیت های پارس آزمون اندازه گیری شد. نمونه های بافتی کبد، کلیه و مغز جهت مطالعات آسیب شناسی در داخل فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفته و مطابق روش های بافت شناسی بلوک های پارافینی تهیه و سپس یرش هایی به

ضخامت ۵ میکرون با میکروتوم تهیه و به روش رایج هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی شدند (۱۴). داده ها با استفاده از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. در صورتی که داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند ($P > 0.05$)، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در صورت معنی دار بودن ($P < 0.05$) میانگین ها، با استفاده از آزمون دانت با گروه شاهد مقایسه شدند و مقادیر با ارزش $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند؛ همچنین نتایج آسیب های بافتی به صورت توصیفی گزارش گردید.

یافته ها:

نتایج وزن نوزادان موش های صحرایی ۱۴ و ۲۱ روزه نشان داد که تنها میانگین وزن نوزادان مادران گروه تیمار دو (اتانول ۴ درصد حجمی) نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری کاهش یافته است ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه تاثیرات دوزهای مختلف اتانول بر وزن بدن نوزادان موش های صحرایی

گروه ها وزن نوزادان	گروه شاهد	گروه یک (اتانول ۲٪ حجمی)	گروه دو (اتانول ۴٪ حجمی)
روز ۷	$11/65 \pm 0/61$	$11/19 \pm 1/4$ Pvalue = ۰/۷۹۲	$10/61 \pm 0/99$ Pvalue = ۰/۳۸۹
روز ۱۴	$21/58 \pm 1/81$	$19/82 \pm 1/41$ Pvalue = ۰/۳۲۹	$16/57 \pm 1/26$ Pvalue = ۰/۰۱۲
روز ۲۱	$32/5 \pm 2/76$	$28/44 \pm 4/11$ Pvalue = ۰/۱۶۵	$23 \pm 1/97$ Pvalue = ۰/۰۰۶

حجم نمونه ۶۳ سر نوزاد موش صحرایی نر در هر گروه می باشد؛ داده ها به صورت "میانگین \pm انحراف معیار" می باشند؛ * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه شاهد است.

جدول شماره ۲: مقایسه دوزهای مختلف اتانول بر طول تاجی دمی و قطر آهیانه در نوزادان موش های صحرایی

گروه ها	متغیرها	طول تاجی - دمی روز ۱۴ (میلی متر)	قطر آهیانه روز ۱۴ (میلی متر)	طول تاجی - دمی روز ۲۴ (میلی متر)	قطر آهیانه روز ۲۴ (میلی متر)
شاهد		۶۰/۱۷ ± ۱/۹۵	۱۶/۹۶ ± ۰/۷۶	۷۷/۱ ± ۴/۰۳	۱۸/۲۸ ± ۰/۸۳
گروه یک (اتانول ۲٪ حجمی)		*۵۴/۸۸ ± ۱/۰۶	*۱۶/۰۳ ± ۰/۶۸	۷۷/۸۳ ± ۲/۱۱	۱۷/۹۵ ± ۰/۲۶
		Pvalue = ۰/۰۰۹	Pvalue = ۰/۰۴۵	Pvalue = ۰/۹۹	Pvalue = ۰/۸۳
گروه دو (اتانول ۴٪ حجمی)		*۴۴/۰۴ ± ۰/۷۷	*۱۵/۵ ± ۰/۳۴	*۶۶/۰۵ ± ۰/۴	*۱۶/۸۵ ± ۰/۴۵
		Pvalue = ۰/۰۰۱	Pvalue = ۰/۰۰۹	Pvalue = ۰/۰۰۱	Pvalue = ۰/۰۱

حجم نمونه ۶۳ سر نوزاد موش صحرایی نر در هر گروه می باشد؛ داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" می باشند؛ * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه شاهد است.

آمینوترانسفراز، نیتروژن اوره خون، کراتین فسفوکیناز و آلکالین فسفاتاز گروه های تیمار یک و دو نسبت به گروه شاهد وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$)؛ اما تغییرات آنزیم های لاکتات دهیدروژناز و کراتینین نوزادان گروه دو نسبت به گروه شاهد معنی دار بوده است ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۳).

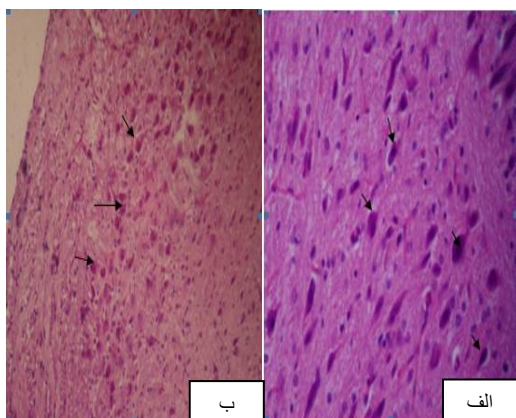
قطر آهیانه و طول تاجی دمی نوزادان ۱۴ روزه گروه های تیمار یک و دو و قطر آهیانه و طول تاجی دمی نوزادان گروه دو نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (جدول شماره ۲).

بررسی بیوشیمیایی سرم نوزادان موش های صحرایی نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات

جدول شماره ۳: مقایسه اثرات اتانول بر تعدادی از پارامترهای بیوشیمیایی نوزادان موش های صحرایی

پارامترهای بیوشیمیایی	گروه ها	گروه شاهد	گروه یک (اتانول ۲٪ حجمی)	گروه دو (اتانول ۴٪ حجمی)
آلکالین فسفاتاز		۱۹۳۱/۶۷ ± ۴۶۰/۷۴	۱۱۵۸/۰۰ ± ۲۴۸/۲۵	۲۸۰۶/۶۷ ± ۱۹۶۹/۴۷
			Pvalue=۰/۴۳۵	Pvalue = ۰/۳۵۵
کراتین فسفوکیناز		۹۷۴/۶۶ ± ۳۸۶/۴۳	۹۳۰/۶۷ ± ۴۱۴/۳۱	۱۱۹۲/۸۳ ± ۴۳۱/۷۸
			Pvalue=۰/۹۸۸	Pvalue = ۰/۳۸۲
نیتروژن اوره خون		۳۵/۰۰ ± ۱/۹۰	۳۴/۳۳ ± ۱/۸۶	۳۷/۸۳ ± ۲/۶۴
			Pvalue = ۰/۸۱۷	Pvalue = ۰/۰۶۹
کراتینین		۰/۴۳ ± ۰/۰۸	۰/۳۷ ± ۰/۰۵	۰/۵۰۰ ± ۰/۱۳
			Pvalue= ۰/۲۷۹	Pvalue=۰/۰۴۱ *
گاماگلوتامیل ترانسفراز		۲/۸۳ ± ۱/۲۸	۲/۹۹ ± ۱/۵۴	۱/۹۳ ± ۲/۲۵
			Pvalue= ۰/۵۷۸	Pvalue = ۰/۹۸۳
آسپاراتات آمینو ترانسفراز		۱۸۷/۸۳ ± ۱۹/۳۱	۱۹۵/۳۳ ± ۲۵/۹۹	۱۸۷/۵۰ ± ۹/۴۸
			Pvalue= ۰/۷۳۴	Pvalue=۰/۹۹۹
آلانین آمینوترانسفراز		۳۸/۶۷ ± ۲۱/۰۰	۳۵/۱۷ ± ۱۱/۰۷	۳۸/۸۳ ± ۵/۰۴
			Pvalue = ۰/۷۳۳	Pvalue = ۰/۹۹۹
لاکتات دهیدروژناز		۱۳۷۹/۰۰ ± ۱۳/۶۱	۱۷۳۳/۰۰ ± ۴۲۷/۰۵	۱۷۳۶/۶۶ ± ۶۰۱/۱۴
			Pvalue = ۰/۰۸۲	Pvalue=۰/۰۳۷ *

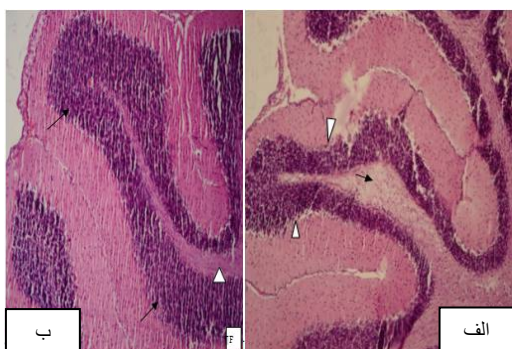
حجم نمونه ۹ سر نوزاد موش صحرایی در هر گروه می باشد؛ داده ها به صورت "میانگین ± انحراف معیار" می باشند؛ * نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه شاهد می باشد.



تصویر شماره ۲: اثر اتانول بر مغز نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه در گروه تیمار دو (اتانول ۴٪ حجمی) در مقایسه با گروه شاهد

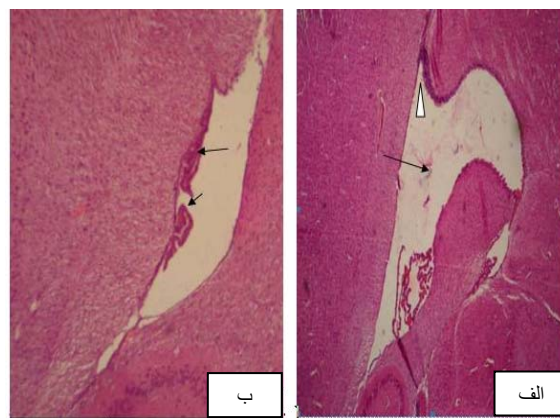
الف: تغییرات ایسکمیک نورونی در ناحیه هسته فاشیال مغز نوزادان موش صحرایی (پیکان) (رنگ آمیزی H&E $4960\times$)؛ ب: نورون های طبیعی مغز نوزادان موش صحرایی (پیکان) گروه شاهد (رنگ آمیزی H&E $400\times$)

کاهش تعداد گلومرول ها و پرخونی مویرگ های فضای بینابینی کورتکس و مدولا در نوزادان گروه تیمار دو مشاهده شد (تصویر شماره ۵)؛ اما بافت های کبد و کلیه نوزادان موش های صحرایی گروه تیمار یک (غلظت حجمی ۲٪) تغییرات میکروسکوپی مشخصی را نشان ندادند.



تصویر شماره ۳: اثر اتانول بر مخچه نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه در گروه تیمار دو (اتانول ۴٪ حجمی) در مقایسه با گروه شاهد

الف: فرایند تخریب یا برداشته شدن غلاف میلین ماده سفید مخچه (پیکان) و کاهش تعداد سلول های عصبی و نکروز سلول های پورکنتر مخچه (سر پیکان) نوزادان موش صحرایی. (رنگ آمیزی H&E $200\times$)؛ ب: ساختار طبیعی قسمت خاکستری (پیکان) و ماده سفید مخچه (سر پیکان) نوزادان گروه شاهد (رنگ آمیزی H&E $240\times$).



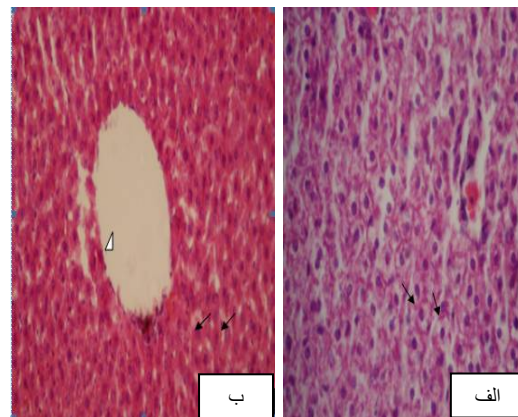
تصویر شماره ۱: اثر اتانول بر بطن های مغز نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه در گروه تیمار یک (اتانول ۲٪ حجمی) در مقایسه با گروه شاهد

الف: اتساع بطن های جانبی (پیکان) و پرولیفراسیون سلول های تحت بطنی مغز (پیکان) نوزادان موش صحرایی قابل مشاهده می باشد. (رنگ آمیزی H&E $100\times$)؛ ب: شبکه کوروتید (سر پیکان) و بطن جانبی طبیعی در گروه شاهد (رنگ آمیزی H&E $100\times$)

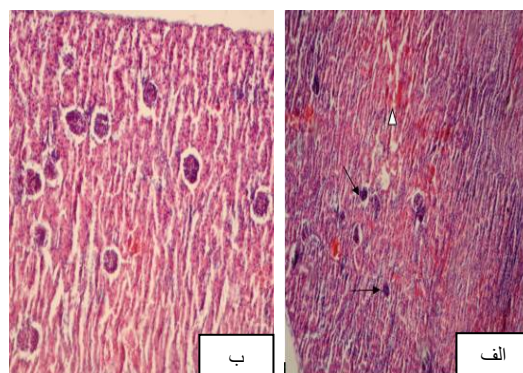
گروه تیمار دو (تصویر شماره ۲) و بصل النخاع، دژنراسیون و نکروز سلول های گرانولار مخچه و از بین رفتن میلین ماده سفید مخچه (تصویر شماره ۳) مشاهده گردید.

مواجهه نوزادان موش های صحرایی شیرده با اتانول به غلظت ۴ درصد حجمی به مدت ۲۴ روز باعث تغییرات بافتی خفیف در کبد، کلیه و مغز شد. در بافت کبد ساختار لبول های کبد کمتر قابل تشخیص بود، سیتوپلاسم سلول های کبدی مجاور سیاهرگ مرکز لبولی (منطقه ۳) و سیتوپلاسم سلول های کبدی حد فاصل سیاهرگ مرکز لبولی و قطعه باب (منطقه ۲) شامل فضاهای شبه واکوئلی خالی و بزرگ بودند، تعدادی از فضاهای روشن بین سلول های کبدی (مویرگ های سینوزوئیدی) با گلبول های قرمز پر شده بود. در تعداد زیادی از حیوانات این گروه افزایش تراکم کروماتین هسته و ساختار فشرده هسته با سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک در منطقه ۲ و ۳ قابل توجه بود. در سیتوپلاسم سلول های کبدی مجاور قطعه باب (منطقه ۱) سلول های کبدی با سیتوپلاسم قرمز و به صورت انفرادی مشاهده شد (تصویر شماره ۴).

موش های صحرایی ۲۵ روزه را که در دوران شیرخواری در معرض اتانول بوده اند را مورد بررسی قرار داده است. نتایج این مطالعه نشان داد، کاهش ۳۰ درصدی وزن در نوزادان شیرخوار و کاهش شاخص های رشد (قطر آهیانه و طول تاجی دمی) گروه تیمار شده با اتانول ۴ درصد نسبت به گروه شاهد می تواند ارتباط مستقیمی با کیفیت و کمیت شیر تولید شده توسط مادر داشته باشد، به طوری که مصرف اتانول در طول دوره بارداری و شیردهی می تواند باعث تغییر در درشت مغذی ها، ریز مغذی ها (۱۵) و آنتی اکسیدان های ترکیبات غذایی شیر شود (۱۶). تحقیقات مختلف نشان داده اند که کاهش تولید شیر ناشی از مصرف اتانول در دوره شیردهی می تواند باعث سوء تغذیه شدید نوزادان و اثرات نامطلوب در نوزادان شیر خوار شود و بدنبال کاهش مکیدن شیر توسط نوزاد بر روی آزاد شدن اکسی توسین و پرولاکتین مادر تاثیر گذار باشد (۱۷، ۱۸). با این حال مکانیسم های احتمالی که باعث کاهش رشد جنین های در معرض اتانول می شود، به روشنی مشخص نیست، اما به نظر نمی رسد مربوط به کمبود هورمون رشد یا تیروئید باشد (۱۹). علاوه بر این کاهش شاخص های رشد (وزن، قطر آهیانه و طول تاجی دمی) نوزادان گروه تیمار نسبت به گروه شاهد می تواند به دلیل اثرات اتانول در نواحی مختلف سیستم اعصاب مرکزی نوزادان از جمله اتساع بطن های جانبی، تغییرات ایسکمیک در نورون های ناحیه بصل النخاع و مخچه باشد، این کاهش وزن در نوزادان وابسته به دوز است و با مطالعات Oyama و همکاران مطابقت دارد (۲۰). در مطالعه حاضر مصرف اتانول در مادران موش صحرایی شیرده در غلظت های ۲ و ۴ درصد حجمی در آب آشامیدنی باعث تغییرات ایسکمیک سلول های عصبی نواحی بصل النخاع، مخچه، اتساع بطن های جانبی مغز و کاهش وزن نوزادان مادران گروه تیمار شد. تکامل سیستم اعصاب مرکزی در جوندگان بعد از تولد اتفاق می افتد که



تصویر شماره ۴: اثر اتانول بر بافت کبد نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه گروه تیمار دو (اتانول ۴٪ حجمی) در مقایسه با گروه شاهد
الف: تورم سلول های کبدی (پیکان) در گروه دو قابل مشاهده می باشد (رنگ آمیزی H&E $\times 400$)؛ ب: کبد نوزادان موش های صحرایی گروه شاهد، ساختار طبیعی سلول های کبدی (پیکان) و ورید مرکز لبولی کبد (سر پیکان) (رنگ آمیزی H&E $\times 400$).



تصویر شماره ۵: اثر اتانول بر بافت کلیه نوزاد موش صحرایی ۲۵ روزه در گروه تیمار دو (اتانول ۴٪ حجمی) در مقایسه با گروه شاهد.
الف: کاهش تعداد و اندازه گلومرول های کلیه (پیکان) و پرخونی مویرگ های بین توبول های کلیه (سر پیکان) در گروه ۲ قابل مشاهده می باشد (رنگ آمیزی H&E $\times 200$)؛ ب: کلیه نوزادان موش های صحرایی گروه شاهد، ساختار طبیعی گلومرول ها و توبول های کلیه (رنگ آمیزی H&E $\times 400$).

بحث:

مطالعه حاضر برخی فعالیت های آنزیمی و تغییرات ساختاری بافت های کبد، کلیه و مغز نوزاد

مشابه سه ماه آخر آبستنی در انسان است (۲۱).

اتانول با اختلال در عملکرد پروتئین ها و لیپیدهای غشاء سلولی باعث آسیب های نورونی می شود (۲۲). به نظر می رسد پس از مصرف طولانی مدت الکل، مغز شروع به استفاده از استات به جای گلوکز به عنوان منبع انرژی می کند (۲۳) و استالددید انباشته اثرات سمی خود را با واکنش بر مهار عملکرد میتوکندری اعمال می کند؛ همچنین شواهد قابل توجهی وجود دارد که اعتیاد به الکل باعث افزایش حساسیت سلول ها به مرگ برنامه ریزی (آپوپتوز) می شود (۲۴). در افراد بالغ غیر الکلی، بیشتر متابولیسم اتانول عمدتاً از طریق الکل دهیدروژناز، آلدئید دهیدروژناز، سیتوکروم P450 2E1 و کاتالاز در کبد رخ می دهد (۲۳، ۲۵). در افرادی که سطح متوسط از اتانول را مصرف می کنند، الکل در واکنشی برگشت پذیر توسط الکل دهیدروژناز کلاس I در سیتوزول سلول های کبد به استالددید اکسید می شود (۲۴، ۲۶). علاوه بر این، میتوکندری نقش مهمی در متابولیسم الکل از طریق آلدئید دهیدروژناز در تبدیل استالددید به استات دارد که روی پروتئین ها یا مولکول های کوچک مثل سیستمین اثر کرده و موجب پراکسیداسیون لیپید، استحالہ یافتن فسفولیپیدهای غشاء سلولی (۲۷) و اکسیداسیون اسید نوکلئیک می شود (۲۴، ۲۵). علاوه بر این استالددید ممکن است با آمین های بیورژنیک مثل هیستامین و سروتونین به شکل ایزو کوئینولین (Isoquinoline) یا ترکیبات کربولین (Carboline compounds) واکنش داده و وارد ذخایر عصبی شده و جایگزین انتقال دهنده های عصبی شده و باعث اختلال در اعمال انتقال دهنده گی مغز می شود (۲۴). کبد مهمترین ارگان در متابولیسم الکل است، افزایش فعالیت آنزیمی آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در سرم، شاخص آسیب کبدی است، این افزایش فعالیت سرمی آنزیم ها مستقیماً با شدت آسیب سلولی ارتباط دارد (۸). مطالعات Bolkent و همکاران نشان داده است که مواجهه با اتانول با دوز ۱ میلی لیتر

از اتانول خالص به ازای هر سر موش صحرایی باعث افزایش ۴ برابری آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه شاهد می شود (۲۸). به نظر می رسد که بیان ریونوکلئیک اسید پیغام رسان آمینوترانسفراز های کبد در حضور سطوح پایین اتانول کاهش می یابد؛ از طرفی فعالیت الکل دهیدروژناز و آلدئید دهیدروژناز کبد جنین و نوزاد کم است (۲۹) ولی الکل در دوزهای بالا باعث القاء بیان آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز میتوکندریایی در سطح سلول های کبد می شود (۸)؛ همچنین تولید دی اکسید کربن بدنال تولید متابولیت های الکل کاهش می یابد که باعث کاهش فعالیت چرخه کربس شده و بدنال آن کاهش فعالیت آنزیمی آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز صورت می گیرد (۸، ۳۰)؛ که با نتایج سنجش آنزیم های سرمی مطالعه حاضر مطابقت می کند.

آنزیم لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم در مسیر گلیکولیز می باشد و دارای ایزوآنزیم های مختلفی است و بدلیل توزیع گسترده آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سیتوپلاسم سلولی بافت های مختلف، بدنال آسیب سلولی آزاد می شود. افزایش معنی دار لاکتات دهیدروژناز سرمی نوزادان گروه تیمار با اتانول ۴ درصد نسبت به گروه شاهد می تواند بدنال اختلالات کبدی، کلیوی، ماهیچه ای، همولیز و آنمی مگالوبلاستیک (در نتیجه کمبود فولات یا ویتامین B12) رخ دهد (۸).

آسیب های بافتی مشاهده شده در بافت کبد نوزادان گروه تیمار با اتانول ۴ درصد می تواند بدنال ورود متابولیت های اتانول به شیر و ورود آنها از طریق ورید باب به کبد باشد که باعث افزایش جذب اکسیژن توسط سلول های کبدی می شود زیرا در نواحی مرکزی لبولار، لبول های کبدی نیازمند متابولیزه شدن هستند. در چنین شرایطی جریان خون کبد افزایش می یابد، اما این افزایش نمی تواند با نیاز بالای متابولیسم اتانول و متابولیت های فعال آن رقابت

کند؛ بنابراین هیپوکسی مرکز لبولار اتفاق می افتد (۱۱). از طرفی فعالیت آنتی اکسیدان ها در جنین در حال تکامل، پایین است و افزایش استرس اکسیداتیو بدنال افزایش تولید رادیکال های آزاد در جنین در حال تکامل، باعث آسیب به دی اکسی ریبونوکلیک اسید بافت های در حال تقسیم سلولی مثل مغز و کبد می شود و موجب تغییر شاخص های آپوپتیک BAX، BCL2 و مرگ برنامه ریزی شده و کاهش تعداد سلول های بافت و اندازه ارگان می شود (۶). مطالعات نشان داده اند که مواجهه موش های صحرایی با اتانول با غلظت حجمی ۱۰ درصد به مدت ۱۲ هفته باعث افزایش معنی داری در آنزیم های آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نسبت به گروه شاهد نشده، اما تغییرات پاتولوژیک در بافت کبد شامل تورم و رقیق شدن سیتوپلاسم سلول های کبدی (دژنراسیون بالونی) ناحیه دو و سه لبول کبد، اتساع سینوزوئیدها و انباشته شدن آنها با گلبول قرمز و مشاهده سلول های آپوپتیک در ناحیه ۱ لبول کبد بوده است (۱۱) که با مطالعات حاضر مطابقت دارد. همچنین در این تحقیق مصرف روزانه ۲ تا ۴ درصد حجمی از اتانول به مدت ۲۴ روز توسط موش های صحرایی ماده شیرده تغییری در آنزیم گاما گلو تامل ترانسفراز نداده بود، که این یافته با مطالعات Sharpe هم خوانی دارد (۳۰).

Gray و همکاران نشان دادند مواجهه حاد با اتانول در موش های صحرایی آبستن موجب کاهش ۱۵ درصدی تعداد نفرون ها در روز سی ام بعد از تولد و افزایش ۱۰ درصدی فشار خون در سن ۶ ماهگی می شود؛ همچنین مطالعات مختلف نشان داده اند که اتانول تکامل کلیه را محدود نموده و موجب کاهش شاخه های مجاری جمع کننده ادراری (Branching ureteric) و کاهش تعداد گلو مرونل های جنین می شود (۶)؛ که این کاهش تعداد گلو مرونل ها

تا اندازه ای با مطالعات ما مطابقت دارند. اسید رتینوئیک فرم اسیدی ویتامین A است و گیرنده های آن نقش مهمی در تکامل کلیه بازی می کنند، از طرفی متابولیسم اتانول و سنتز اسید رتینوئیک توسط مسیر آنزیمی مشترک شامل الکل دهیدروژناز و آلدئید دهیدروژناز انجام می شود، که با نشانگان جنین الکلی مرتبط است (۶). در مطالعه حاضر افزایش غلظت کراتینین سرم گروه تیمار شده با اتانول ۴ درصد می تواند بدلیل نقص عملکرد کلیوی نوزادان باشد که با مطالعات میکروسکوپی مطابقت دارد؛ اما اندازه گیری کراتینین پلاسما به تنهایی به منظور بررسی عملکرد کلیه مورد استفاده قرار نمی گیرد (۸). پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی غلظت اتانول و متابولیت های آن در سرم نوزادان بررسی شود.

نتیجه گیری:

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، اتانول و متابولیسم های آن می تواند از طریق گردش خون مادر به شیر منتقل شده و بر روی شاخص های رشد و بخش هایی از سیستم اعصاب مرکزی نوزادان تاثیر گذار باشند؛ لذا باید با ارائه مشاوره به مادران الکلی در مورد مصرف نوشیدنی های الکلی در دوران شیردهی و عوارض احتمالی در جنین و نوزاد هشدار لازم را داد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از آقای دکتر محمود رفیعان کویایی ریاست محترم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، آقای دکتر اسفندیار حیدریان ریاست محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و همچنین آقای دکتر مصطفی فغانی عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر می نمایم

منابع:

1. Pisani LP, Oller do Nascimento CM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, et al. Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. *Lipids Health Dis*. 2008 Apr; 7: 13.
2. Mennella JA, Gerrish CJ. Effects of exposure to alcohol in mother's milk on infant sleep. *Pediatrics*. 1998 May; 101(5): E2.
3. Pueta M, Abate P, Haymal OB, Spear NE, Molina JC. Ethanol exposure during late gestation and nursing in the rat: effects upon maternal care, ethanol metabolism and infantile milk intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Nov; 91(1): 21-31.
4. Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P, et al. Review article: alcoholic liver disease-pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Oct; 24(8): 1151-61.
5. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc*. 2004 Feb; 63(1): 49-63.
6. Gray SP, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Moritz KM. Mechanism of alcohol-induced impairment in renal development: Could it be reduced by retinoic acid? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Sep; 39(9): 807-13.
7. Kervern M, Dubois C, Naassila M, Daoust M, Pierrefiche O. Perinatal alcohol exposure in rat induces long-term depression of respiration after episodic hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr; 179(7): 608-14.
8. Rakhshan M, Mohammadnejad J, Mota A, Javani F, Rajabi Bazl M. *Tietz Fundamentals of clinical chemistry*. 1st ed. Tehran: Andisheh Rafi Pub; 2011.
9. PersianYoung C, Olney JW. Neuroapoptosis in the infant mouse brain triggered by a transient small increase in blood alcohol concentration. *Neurobiol Dis*. 2006 Jun; 22(3): 548-54.
10. Fiuza TS, Morais JOR. Immunohistochemical evaluation of the postnatal effects of acute exposure to ethanol on the kinetics of granule-cell migration in rat cerebellum. *Braz J Morphol Sci*. 2005; 22(1): 19-24
11. Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Piłat-Marcinkiewicz B, Sawicki B. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol*. 2003 Jan-Feb; 38(1): 2-10.
12. Namjoo AR, Kargar SAR, Heidarian E, Ashje A, Malki S. The toxicity effect of methyl mercury chloride on newborn rat: Enzymatic, histology change and mercury accumulation. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2012; 14(2): 101-11.
13. Maldaner FH, Durgante LP, Murussi M, Xavier MK, Dalmaz C, Ferreira MB. Effects of chronic ethanol consumption on gestation and lactation in rats. *Integr Physiol Behav Sci*. 1994 Apr-Jun; 29(2): 141-50.
14. Namjoo AR, Kargar SAR, Heidarian E, Ashje A, Malki S. The toxicity effect of methyl mercury chloride on newborn rat: Enzymatic, histology change and mercury accumulation. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2012 May, June; 14(2): 101-111
15. Azara CR, Maia IC, Rangel CN, Silva-Neto MA, Serpa RF, De Jesus EF, et al. Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. *Biol Res*. 2008; 41(3): 317-30.
16. Ojeda ML, Vazquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Int J Environ Res Public Health*. 2009 Aug; 6(8): 2139-49.

17. Tavares do Carmo MG, Oller do Nascimento CM, Martin A, Herrera E. Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. *Alcohol*. 1999 May; 18(1): 71-6.
18. Subramanian MG. Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat. *Alcohol*. 1995 Mar-Apr; 12(2): 137-43.
19. Aros S, Mills JL, Iniguez G, Avila A, Conley MR, Troendle J, et al. Effects of prenatal ethanol exposure on postnatal growth and the insulin-like growth factor axis. *Horm Res Paediatr*. 2011; 75(3): 166-73.
20. Oyama LM, Couto RC, Couto GE, Damaso AR, Oller do Nascimento CM. Ethanol intake during lactation II: Effects On pups' liver and brain metabolism. *Alcohol*. 2000 Jul; 21(3): 201-6.
21. Woolfrey KM, Hunt PS, Burk JA. Postnatal ethanol exposure disrupts signal detection in adult rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2005 Nov-Dec; 27(6): 815-23.
22. Phillips DE. Effects of limited postnatal ethanol exposure on the development of myelin and nerve fibers in rat optic nerve. *Exp Neurol*. 1989 Jan; 103(1): 90-100.
23. Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Nov; 49(9): 703-9.
24. Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Dec; 7(12): 4281-304.
25. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006; 29(4): 245-54.
26. Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita*. 2006; 42(1): 8-16.
27. Kerai MDJ, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA. Reversal of ethanol- Induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: A study in rats. *Alcohol Alcohol*. 1999 Jul-Aug; 34(4): 529-41.
28. Bolkent S, Arda-Pirincci P, Bolkent S, Yanardag R, Tunali S, Yildirim S. Influence of zinc sulfate intake on acute ethanol-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul; 12(27): 4345-51.
29. Azorin I, Portoles M, Marin P, Lazaro-Dieguez F, Megias L, Egea G, et al. Prenatal ethanol exposure alters the cytoskeleton and induces glycoprotein microheterogeneity in rat newborn hepatocytes. *Alcohol Alcohol*. 2004 May-Jun; 39(3): 203-12.
30. Sharpe PC. Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence. *Ann Clin Biochem*. 2001 Nov; 38(Pt 6): 652-64.

Low dose effects of ethanol on suckling rats: Enzymes activity, histological alterations and growth parameters.

Abbasi M (DVM)¹, Namjoo AR (PhD)^{2*}

¹Veterinary Dept., Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran; ²Pathology Dept., Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran

Received: 15/July/2012 Revised: 5/Nov/2013 Accepted: 10/Nov/2013

Background and aims: Lower concentration of ethanol can be transferred to fetus through the placenta and to newborn offspring through breast milk. This study aimed at investigating the effects of lactation exposure to ethanol on some biochemical and pathological alterations in brain, liver and kidney tissues of in suckling rat.

Methods: In this experimental study 21 adult female wistar rats were divided in 3 groups, 2 experimental and 1 control group, the experimental groups received tap water with 2 and 4 % ethanol v/v and control group only received tap water during lactation period. On day 25 after birth, 9 pup rats from each experimental group were anesthetized. Blood samples were collected, alanine amino transferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), aspartate amino transferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase, Blood nitrogen urea (BUN) and Creatinine were determined according to routine laboratory method. Histopathological examination of the brain, liver and kidney were also performed. The data were analyzed using ANOVA and Dunnett tests.

Results: Use of ethanol did not cause any significant difference in ALT, GGT, AST, ALP and BUN experimental groups in comparison with the control group ($P>0.05$). But LDH, creatine significantly increased in experimental groups received tap water with 4% ethanol v/v compared to the control group, respectively ($P<0.05$). In histopathologic study, mild injuries were observed in kidney, liver and brain tissues of offspring rat exposed to 4% ethanol v/v.

Conclusion: Alcohol consumption during lactation period can result in irrecoverable harms offspring.

Keywords: Ethanol, Lactation, Neurotoxicity, Suckling rats, Wistar rat.

Cite this article as: Abbasi M, Namjoo AR. Low dose effects of ethanol on suckling rats: Enzymes activity, histological alterations and growth parameters. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Feb, March; 15(6): 54-64.

***Corresponding author:**

Pathology Dept., Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran.
Tel: 00983813361060, E-mail: ar.namjo72@iaushk.ac.ir